

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018437

International filing date: 03 December 2004 (03.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-018344
Filing date: 27 January 2004 (27.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 27 January 2005 (27.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/JP2004/018437

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

03.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 1 月 2 7 日

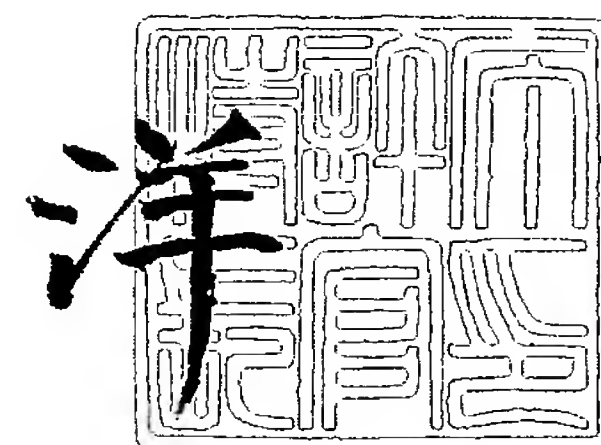
出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 1 8 3 4 4
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 1 8 3 4 4]

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人理化学研究所
株式会社医学生物学研究所

2 0 0 5 年 1 月 1 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 2 2 6 5 5

【書類名】 特許願
【整理番号】 A31700A
【提出日】 平成16年 1月27日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内
 【氏名】 宮脇 敦史
【発明者】
 【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内
 【氏名】 小暮 貴子
【発明者】
 【住所又は居所】 長野県伊那市大字手良沢岡字大原 1 0 6 3 - 1 0 3 株式会社医
 学生物学研究所 伊那研究所内
 【氏名】 唐澤 智司
【特許出願人】
 【識別番号】 503359821
 【氏名又は名称】 独立行政法人理化学研究所
【特許出願人】
 【識別番号】 390004097
 【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所
【代理人】
 【識別番号】 110000109
 【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス
 【代表者】 今村 正純
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 170347
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0316216

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

以下の (a) 又は (b) に示す色素蛋白質。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質。

【請求項 2】

以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質。

(a) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有する蛋白質。

【請求項 3】

以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質。

(a) 配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有し、かつ 1 0 0 n m 以上のストークスシフトを有する蛋白質。

【請求項 4】

以下の (a) 又は (b) に示す色素蛋白質をコードする D N A。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質。

【請求項 5】

以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質をコードする D N A。

(a) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有する蛋白質。

【請求項 6】

以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質をコードする D N A。

(a) 配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有し、かつ 1 0 0 n m 以上のストークスシフトを有する蛋白質。

【請求項 7】

以下の (a) 又は (b) に示す D N A。

(a) 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する D N A；

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する D N A。

【請求項 8】

以下の (a) 又は (b) に示す D N A。

(a) 配列番号 4 に記載の塩基配列を有する D N A；

(b) 配列番号 4 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する D N A。

【請求項 9】

以下の (a) 又は (b) に示す D N A。

(a) 配列番号 6 又は 8 に記載の塩基配列を有する D N A；

(b) 配列番号 6 又は 8 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ、蛍光特性を有し、1 0 0 n m 以上のストーク

スシフトを有する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA。

【請求項 1 0】

請求項 4 から 9 の何れかに記載の DNA を有する組み換えベクター。

【請求項 1 1】

請求項 4 から 9 の何れかに記載の DNA 又は請求項 1 0 に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。

【請求項 1 2】

請求項 1 から 3 の何れかに記載の蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛋白質。

【請求項 1 3】

他の蛋白質が細胞内に局在する蛋白質である、請求項 1 2 に記載の融合蛋白質。

【請求項 1 4】

他の蛋白質が細胞内小器官に特異的な蛋白質である、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の融合蛋白質。

【請求項 1 5】

請求項 1 2 から 1 4 の何れか 1 項に記載の融合蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 から 3 の何れかに記載の蛍光蛋白質、請求項 4 から 9 の何れかに記載の DNA、請求項 1 0 に記載の組み換えベクター、請求項 1 1 に記載の形質転換体、又は請求項 1 2 から 1 4 の何れか 1 項に記載の融合蛋白質を含む、試薬キット。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光蛋白質

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、新規な色素蛋白質並びに蛍光蛋白質に関する。より詳細には、本発明は、コモンサンゴ (Montipora. sp) 由来の新規な色素蛋白質及び蛍光蛋白質、並びにその利用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

クラゲのエクオレア・ビクトリア (Aequorea victoria) に由来する緑色蛍光蛋白質 (GFP) は、生物系において多くの用途を有する。最近、ランダム突然変異誘発法および半合理的 (semi-rational) 突然変異誘発法に基づいて、色を変化させたり、折りたたみ特性を改善したり、輝度を高めたり、あるいは pH 感受性を改変したといった様々な GFP 変異体が作製されている。遺伝子組み換え技術により他の蛋白質を GFP 等の蛍光蛋白質に融合させて、それらの発現および輸送のモニタリングを行うことが行われている。

【0 0 0 3】

最もよく使用される GFP 変異体の一つとして黄色蛍光蛋白質 (YFP) が挙げられる。YFP は、クラゲ (Aequorea) GFP 変異体の中でも最長波長の蛍光を示す。大部分の YFP の ϵ および ϕ は、それぞれ $60,000 \sim 100,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ および $0.6 \sim 0.8$ であり (Tsien, R. Y. (1998). Ann. Rev. Biochem. 67, 509-544)、これらの値は、一般的な蛍光団 (フルオレセインおよびローダミンなど) の値に匹敵する。従って YFP の絶対的輝度の改善は、ほぼ限界に達しつつある。

【0 0 0 4】

また、GFP 変異体の他の例として、シアン色蛍光蛋白質 (CFP) があり、ECFP (enhanced cyan fluorescent protein) が知られている。また、イソギンチャク (Discom a sp.) からは赤色蛍光蛋白質 (RFP) も単離されており、DasRed が知られている。このように蛍光蛋白質は、緑色、黄色、シアン色、赤色の 4 種が次々と開発されスペクトルの範囲は大幅に広がっている。

【0 0 0 5】

オワンクラゲ由来の GFP ホモログの中には、ストークスシフト (励起のピーク値と蛍光のピーク値の差) の大きいタイプのもの (GFPuv, sapphire) があるが、380nm の UV 光で励起して緑色蛍光を取得するため、生物内での観察には毒性をもつ UV 光の使用は適さない。赤色蛍光蛋白質についてはストークスシフトの大きなものは存在せず、蛍光観察においては、励起もしくは蛍光のどちらかを犠牲にしなければならないのが現状である。

【0 0 0 6】

【非特許文献 1】 Tsien, R. Y. (1998). Ann. Rev. Biochem. 67, 509-544

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 7】

蛍光蛋白質は低分子の蛍光物質に比して励起と蛍光のスペクトルがブロードである。そして、多くの蛍光蛋白質では励起スペクトルと蛍光スペクトルの重なりがあるため、励起のピーク値で励起して蛍光のピーク値で観測することが非常に困難である。本発明は、上記した問題点を解消した蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、励起のピーク値 (吸収極大波長) と蛍光のピーク値 (蛍光極大波長) の差 (ストークスシフト) を大きくすることにより、最大の励起で最大の蛍光を得ることができることを特徴とする赤色又は橙色の蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 8】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討し、材料としてコモンサンゴ (Montipora. sp) を用いて新規色素蛋白質をコードする遺伝子の単離を試み、色素蛋白質 COCP を

取得した。次いで、C0CP蛋白質の94番目のヒスチジンをアスパラギンに、142番目のアスパラギンをセリンに、157番目のアスパラギンをアスパラギン酸に、201番目のリジンをアルギニンに、206番目のフェニルアラニンをセリンに置き換えることにより蛍光性を獲得した蛍光蛋白質C0CP-FLを作成した。C0CP-FLは560nmに励起のピークを持ち、この励起によって蛍光スペクトルは600nmにピークした。さらに、本発明者らは、上記C0CP-FLの61番目のセリンをフェニルアラニンに、92番目のイソロイシンをトレオニンに、123番目のバリンをトレオニンに、158番目のフェニルアラニンをチロシンに、191番目のバリンをイソロイシンに、213番目のセリンをアラニンに置き換えることによりC0CP-FLとは異なる蛍光特性をもつ蛋白質keima616を作成した。keima616は、440nmに励起のピークをもち、この励起によって蛍光スペクトルは616nmにピークを持ち、ストークスシフトは176nmと非常に大きな値であった。さらに、本発明者らは、Keima616の61番目のフェニルアラニンをメチオニンに、62番目のグルタミンをシステインに置き換えることにより蛍光蛋白質Keima570を作成した。このKeima570はKeima616と同様440nmに励起のピークを持ち、この励起により570nmの蛍光のピークを示し、ストークスシフトは130nmと大きな値であった。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0009】

即ち、本発明によれば、以下の（a）又は（b）に示す色素蛋白質が提供される。

- （a）配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；
- （b）配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質。

【0010】

本発明の別の態様によれば、以下の（a）又は（b）に示す蛍光蛋白質が提供される。

- （a）配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；
- （b）配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有する蛋白質。

【0011】

本発明のさらに別の態様によれば、以下の（a）又は（b）に示す蛍光蛋白質が提供される。

- （a）配列番号5又は7に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；
- （b）配列番号5又は7に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有し、かつ100nm以上のストークスシフトを有する蛋白質。

【0012】

本発明のさらに別の態様によれば、以下の（a）又は（b）に示す色素蛋白質をコードするDNAが提供される

- （a）配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；
- （b）配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質。

【0013】

本発明のさらに別の態様によれば、以下の（a）又は（b）に示す蛍光蛋白質をコードするDNAが提供される。

- （a）配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；
- （b）配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有する蛋白質。

【0014】

本発明のさらに別の態様によれば、以下の（a）又は（b）に示す蛍光蛋白質をコードするDNAが提供される。

- （a）配列番号5又は7に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；
- （b）配列番号5又は7に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有し、かつ100nm以上の

ストークスシフトを有する蛋白質。

【0015】

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す DNA が提供される。

(a) 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA；

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA。

【0016】

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す DNA が提供される。

(a) 配列番号 4 に記載の塩基配列を有する DNA；

(b) 配列番号 4 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA。

【0017】

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す DNA が提供される。

(a) 配列番号 6 又は 8 に記載の塩基配列を有する DNA；

(b) 配列番号 6 又は 8 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ、蛍光特性を有し、100nm 以上のストークスシフトを有する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA。

【0018】

本発明のさらに別の態様によれば、上記何れかの DNA を有する組み換えベクターが提供される。本発明のさらに別の態様によれば、上記何れかの DNA 又は組み換えベクターを有する形質転換体が提供される。

【0019】

本発明のさらに別の態様によれば、上記何れかの蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛋白質が提供される。好ましくは、他の蛋白質は細胞内に局在する蛋白質である。さらに好ましくは、他の蛋白質は細胞内小器官に特異的な蛋白質である。

【0020】

本発明のさらに別の態様によれば、上記何れかの融合蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、上記何れかの蛍光蛋白質、DNA、組み換えベクター、形質転換体、又は融合蛋白質を含む、試薬キットが提供される。

【発明の効果】

【0021】

本発明の蛍光蛋白質は赤色、橙色の蛍光を放ち、励起のピークが440nm（青色）である。ストークスシフト（励起のピーク値と蛍光のピーク値の差）は従来の赤色蛍光蛋白質（DsRed、HcRed）では20nm～30nmであるのに対し、本発明の赤色蛍光蛋白質が176nm、橙色蛍光蛋白質が130nmと非常に大きい。故に本発明の蛍光蛋白質は最大の励起で最大の蛍光を得ることができることを特徴とする。また、励起のピークが440nmであるため、青緑蛍光蛋白質（CFP）や緑色蛍光蛋白質（GFP）との同時励起染色において両者の蛍光を非常に有効に取得することが可能である。さらに従来の赤色蛍光蛋白質の励起ピークが560nmから590nmであるのに対し、本発明の蛍光蛋白質は励起のピークが440nmであるので、励起光を変えて従来の赤色蛍光蛋白質と同時に染色することも可能とした。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(1) 本発明の蛋白質

本発明の蛋白質は、配列番号 1、3、5 又は 7 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；並びに配列番号 1、3、5 又は 7 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、吸光特性又は蛍光特性を有する蛋白質である。配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のストークスシフト（吸収極大波長と蛍光極大波長の差）はそれぞれ 1 7 6 nm および 1 3 0 nm である。配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有する蛋白質については、そのストークスシフトは 1 0 0 nm 以上、より好ましくは 1 2 0 nm 以上になるものとする。

【0 0 2 3】

本発明の蛋白質は、下記の特性を有することを特徴とする。

(1) COCP（アミノ酸配列を配列番号 1 に示し、塩基配列を配列番号 2 に示す）

励起極大波長（吸収極大波長）：5 7 6 nm

5 7 6 nm におけるモル吸光係数：6 4 0 0 0

pH 感受性：なし

【0 0 2 4】

(2) COCP-FL（アミノ酸配列を配列番号 3 に示し、塩基配列を配列番号 4 に示す）

励起極大波長（吸収極大波長）：5 6 0 nm

蛍光極大波長：6 0 0 nm

【0 0 2 5】

(3) keima616（アミノ酸配列を配列番号 5 に示し、塩基配列を配列番号 6 に示す）

励起極大波長（吸収極大波長）：4 4 0 nm

蛍光極大波長：6 1 6 nm

pH 感受性：pH 7. 5 ～ 1 0 で蛍光強度は安定

【0 0 2 6】

(4) keima570（アミノ酸配列を配列番号 7 に示し、塩基配列を配列番号 8 に示す）

励起極大波長（吸収極大波長）：4 4 0 nm

蛍光極大波長：5 7 0 nm

pH 感受性：pH 7. 5 ～ 1 0 で蛍光強度は安定

【0 0 2 7】

本明細書中の実施例においては、本発明の蛋白質をコードする DNA は、コモンサンゴ（*Montipora. sp*）を出発材料としてクローニングされた。コモンサンゴ（*Montipora. sp*）は、刺胞動物門花虫綱六放サンゴ亜綱イシサンゴ目ミドリイシ科に属するサンゴの 1 種であり、塊状や被覆状の群体を形成することが多い。なお、コモンサンゴ（*Montipora. sp*）以外の蛍光を発するサンゴから本発明の蛋白質を取得することができる場合もあり、そのような蛋白質も本発明の範囲内である。

【0 0 2 8】

本明細書で言う「1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列」における「1 から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1 から 2 0 個、好ましくは 1 から 1 0 個、より好ましくは 1 から 7 個、さらに好ましくは 1 から 5 個、特に好ましくは 1 から 3 個程度を意味する。

【0 0 2 9】

本明細書において、「吸光特性を有する蛋白質」とは一定の波長の光を吸収できる性質を有する蛋白質を意味する。「配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質」の吸光特性は、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の吸光特性と実質的に同一でもよいし、異なってもよい。吸光特性は、例えば、吸光強度、励起波長（吸収波長）、pH 感受性などにより評価することができる。本発明の蛋白質のうち吸光特性を有し、蛍光を発しない色素蛋白質は、(1) FRET のアクセプター分子（エネルギー受容体）として用いたり、(2) 照射した光のエネルギーを光以外のエネルギーに変換させるシステムの開発に利用したり、あるいは (3) 蛋白質のアミノ酸配列に変異を導入し

て蛍光を発するように改変することなどに用いることができる。

【0030】

本明細書において、「蛍光特性を有する蛋白質」とは、一定の波長の光で励起することにより蛍光を発することができる性質を有する蛋白質を意味する。「配列番号3、5又は7に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有する蛋白質」の蛍光特性はそれぞれ、配列番号3、5又は7に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の蛍光特性と実質的に同一でもよいし、異なってもよい。蛍光特性は、例えば、蛍光強度、励起波長、蛍光波長、pH感受性などにより評価することができる。

【0031】

本発明の色素蛋白質又は蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

【0032】

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1、3、5又は7に記載したアミノ酸配列並びに配列番号2、4、6又は8に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いてコモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来のcDNAライブラリーを鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛋白質をコードするDNAを取得することができる。本発明の蛋白質をコードするDNAの一部の断片を上記したPCRにより得た場合には、作製したDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の蛋白質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

【0033】

(2) 本発明のDNA

本発明によれば、本発明の色素蛋白質又は蛍光蛋白質をコードするDNAが提供される。

本発明の蛋白質をコードするDNAの具体例としては、以下の(a)又は(b)に示す蛋白質をコードするDNAが挙げられる。

(a) 配列番号1、3、5又は7に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号1、3、5又は7に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、吸光特性又は蛍光特性を有する蛋白質。

【0034】

本発明の色素蛋白質又は蛍光蛋白質をコードするDNAの更なる具体例としては、以下の(a)又は(b)に示すDNAもまた挙げられる。

(a) 配列番号2、4、6又は8に記載の塩基配列を有するDNA；

(b) 配列番号2、4、6又は8に記載の塩基配列において、1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ吸光特性又は蛍光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有するDNA。

【0035】

本明細書で言う「1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列」における「1から数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から50個、好ましくは1から30個、より好ましくは1から20個、さらに好ましくは1から10個、特に好ましくは1から5個程度を意味する。

【0036】

本発明のDNAは、例えばホスホアミダイト法などにより合成することができるし、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって製造することもできる。本発明のDNA又はその断片の作製方法については、本明細書中上述した通りである。

【0 0 3 7】

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いる P C R、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有する D N A を構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N Y., 1989、並びに Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997) に記載されている。

【0 0 3 8】

(3) 本発明の組み換えベクター

本発明の D N A は適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター（例えばプラスミド等）でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

【0 0 3 9】

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明の D N A は、転写に必要な要素（例えば、プロモータ等）が機能的に連結されている。プロモータは宿主細胞において転写活性を示す D N A 配列であり、宿主の種類に応じて適宜することができる。

【0 0 4 0】

細菌細胞で作動可能なプロモータとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子(Bacillusstearothermophilus maltogenic amylase gene)、バチルス・リケニホルミス α アミラーゼ遺伝子(Bacillus licheniformis alpha-amylase gene)、バチルス・アミロリケファチエンス・BANアミラーゼ遺伝子(Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子(Bacillus Subtilis alkaline protease gene)もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子(Bacillus pumilus xylosidase gene)のプロモータ、またはファージ・ラムダの P_R若しくは P_Lプロモータ、大腸菌の lac、trp若しくは tacプロモータなどが挙げられる。

【0 0 4 1】

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、S V 4 0 プロモータ、M T - 1 (メタロチオネイン遺伝子) プロモータ、またはアデノウイルス 2 主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P 1 0 プロモータ、オートグラフィア・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性蛋白プロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子 1 プロモータ、またはバキュウロウイルス 3 9 K 遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、T P I 1 プロモータ、A D H 2-4c プロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、A D H 3 プロモータまたは t p i A プロモータなどがある。

【0 0 4 2】

また、本発明の D N A は必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主については T P I 1 トーミネータ若しくは A D H 3 トーミネータのような適切なトーミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えば S V 4 0 またはアデノウイルス 5 E 1 b 領域由来のもの)、転写エンハンサ配列(例えば S V 4 0 エンハンサ) および翻訳エンハンサ配列(例えばアデノウイルス V A R N A をコードするもの)のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にする D N A 配列を具備してもよく、その一例としては S V 4 0 複製起点(宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。

【 0 0 4 3 】

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカ含有してもよい。選択マーカとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) またはシゾサッカロマイセス・ポンベ T P I 遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

本発明の DNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび／または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

【 0 0 4 4 】

(4) 本発明の形質転換体

本発明の DNA 又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明の DNA または組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明の DNA 構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

【 0 0 4 5 】

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行えばよい。

哺乳類細胞の例としては、H E K 2 9 3 細胞、H e L a 細胞、C O S 細胞、B H K 細胞、C H L 細胞または C H O 細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入された DNA 配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

【 0 0 4 6 】

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはサッカロマイセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*) 等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

【 0 0 4 7 】

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスポラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA 構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA 構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

【 0 0 4 8 】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる (例えば、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual ; 及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47(1988)等に記載)。

【 0 0 4 9 】

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞である S f 9、S f 2 1 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞である H i F i v e (インビ

トロジェン社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

【0050】

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の蛍光融合蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0051】

(5) 本発明の蛋白質及びそれを含む融合蛋白質の利用

本発明は蛋白質を他の蛋白質と融合させることにより、融合蛋白質を構築することができる。

本発明の融合蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1、3、5又は7に記載したアミノ酸配列及び配列番号2、4、6又は8に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、本発明の蛋白質の遺伝子を含むDNA断片を鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛋白質をコードするDNAを構築するのに必要なDNA断片を作製することができる。また同様に、融合すべき蛋白質をコードするDNA断片も入手する。

【0052】

次いで、これらのDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の融合蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の融合蛋白質を産生することができる。

【0053】

本発明の蛍光蛋白質は、特に、標識としての利用価値が高い。即ち、本発明の蛋白質を被検アミノ酸配列との融合蛋白質として精製し、マイクロインジェクション法などの手法により細胞内に導入し、該融合蛋白質の分布を経時的に観察すれば、被検アミノ酸配列の細胞内におけるターゲティング活性を検出することが可能である。

【0054】

本発明の蛋白質を融合させる他の蛋白質(被検アミノ酸配列)の種類は特に限定されるものではないが、例えば、細胞内に局在する蛋白質、細胞内小器官に特異的な蛋白質、ターゲティングシグナル(例えば、核移行シグナル、ミトコンドリアプレ配列)等が好適である。なお、本発明の蛋白質は、マイクロインジェクション法などにより細胞内に導入する以外に、細胞内で発現させて用いることも可能である。この場合には、本発明の蛋白質をコードするDNAが発現可能に挿入されたベクターが宿主細胞に導入される。

【0055】

また、本発明の蛋白質は、レポーター蛋白質としてプロモータ活性の測定に用いることも可能である。即ち、被検プロモータの下流に、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが配置されたベクターを構築し、これを宿主細胞に導入し、該細胞から発せられる本発明

の蛍光蛋白質の蛍光を検出することにより、被検プロモータの活性を測定することが可能である。被検プロモータとしては、宿主細胞内で機能するものであれば、特に制限はない。

【 0 0 5 6 】

上記アミノ酸配列のターゲティング活性の検出やプロモータ活性の測定において用いられるベクターとしては、特に制限はないが、例えば、動物細胞用ベクターでは、「pNEO」(P. Southern, and P. Berg (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:327)、「pCAGGS」(H. Niwa, K. Yamamura, and J. Miyazaki. Gene 108, 193-200 (1991))、「pRc/CMV」(インビトロゲン社製)、「pCDM8」(インビトロゲン社製)などが、酵母用ベクターでは、「pRS303」, 「pRS304」, 「pRS305」, 「pRS306」, 「pRS313」, 「pRS314」, 「pRS315」, 「pRS316」(R. S. Sikorski and P. Hieter (1989) Genetics 122: 19-27)、「pRS423」, 「pRS424」, 「pRS425」, 「pRS426」(T. W. Christianson, R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Shero, and P. Hieter (1992) Gene 110: 119-122)などが好適に用いられる。

【 0 0 5 7 】

また、使用可能な細胞の種類も特に限定されず、各種の動物細胞、例えば、L細胞、BalbC-3T3細胞、NIH3T3細胞、CHO(Chinese hamster ovary)細胞、HeLa細胞、NRK(normal rat kidney)細胞、「Saccharomyces cerevisiae」などの酵母細胞や大腸菌(E. coli)細胞などを使用することができる。ベクターの宿主細胞への導入は、例えば、リン酸カルシウム法やエレクトロポレーション法などの常法により行うことができる。

【 0 0 5 8 】

上記のようにして得た、本発明の蛋白質と他の蛋白質(蛋白質Xとする)とを融合させた融合蛋白質を細胞内で発現させ、発する蛍光をモニターすることにより、細胞内における蛋白質Xの局在や動態を分析することが可能になる。即ち、本発明の融合蛋白質をコードするDNAで形質転換またはトランスフェクトした細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより細胞内における蛋白質Xの局在や動態を可視化して分析することができる。

【 0 0 5 9 】

例えば、蛋白質Xとして細胞内オルガネラに特異的な蛋白質を利用することにより、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、分泌小胞、ペルオキシソームなどの分布や動きを観察できる。

また、例えば、神経細胞の軸索、樹状突起などは発生途中の個体の中で著しく複雑な走向の変化を示すので、こういった部位を蛍光ラベルすることにより動的解析が可能になる。

【 0 0 6 0 】

本発明の蛍光蛋白質の蛍光は、生細胞のまま検出することが可能である。この検出は、例えば、蛍光顕微鏡(カールツァイス社 アキシオフォト フィルターセット09)や画像解析装置(ATTO デジタルイメージアナライザー)などを用いて行うことが可能である。

顕微鏡の種類は目的に応じて適宜選択できる。経時変化を追跡するなど頻回の観察を必要とする場合には、通常の落射型蛍光顕微鏡が好ましい。細胞内の詳細な局在を追及したい場合など、解像度を重視する場合は、共焦点レーザー顕微鏡の方が好ましい。顕微鏡システムとしては、細胞の生理状態を保ち、コンタミネーションを防止する観点から、倒立型顕微鏡が好ましい。正立顕微鏡を使用する場合、高倍率レンズを用いる際には水浸レンズを用いることができる。

【 0 0 6 1 】

フィルターセットは蛍光蛋白質の蛍光波長に応じて適切なものを選択できる。例えば、keima616の場合は励起極大波長(吸収極大波長)が440nm、蛍光極大波長が616nmであることから、励起光420~460nm、蛍光600~640nm程度のフィルターを使用することが好ましい。また、keima570の場合は励起極大波長(吸収極大波長)が440nm、蛍光極大波長が570nmであることから、励起光420~460nm、蛍光550~590nm程度のフィルターを使用することが好ましい。

【 0 0 6 2 】

また、蛍光顕微鏡を用いた生細胞での経時観察を行う場合には、短時間で撮影を行うべきなので、高感度冷却 CCD カメラを使用する。冷却 CCD カメラは、CCD を冷却することにより熱雑音を下げ、微弱な蛍光像を短時間露光で鮮明に撮影することができる。

【0063】

(6) 本発明のキット

本発明によれば、本明細書に記載した蛋白質、融合蛋白質、DNA、組み換えベクター又は形質転換体から選択される少なくとも1種以上を含むことを特徴とする、細胞内成分の局在の分析及び／又は生理活性物質の分析のためのキットが提供される。本発明のキットは、それ自体既知の通常用いられる材料及び手法で調製することができる。

蛍光蛋白質又はDNAなどの試薬は、適当な溶媒に溶解することにより保存に適した形態に調製することができる。溶媒としては、水、エタノール、各種緩衝液などを用いることができる。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0064】

実施例 1 : イシサンゴからの新規色素蛋白遺伝子の単離、新規蛍光蛋白の作製、及び特性解析

(1) total RNAの抽出

珊瑚より色素蛋白質の遺伝子の単離を行った。材料にはコモンサンゴ (*Montipora*. sp) を用いた。凍結したコモンサンゴを乳鉢で碎き、湿重量 1 グラムに "TRIzol" (GIBCO BRL) を 7.5 ml 加えてホモジナイズし、1500×g で 10 分間遠心した。上清にクロロホルム 1.5 ml を加え、15 秒間攪拌した後、3 分間静置した。7500×g で 15 分間遠心した。上清にイソプロパノール 3.75 ml を加え、15 秒間攪拌した後、10 分間静置した。17000×g で 10 分間遠心した。上清を捨て 70% エタノールを 6 ml 加えて 17000×g で 10 分間遠心した。上清を捨て、沈殿を DEPC 水 200 μ l で溶解した。DEPC 水で溶解した total RNA を 100 倍に希釈して、0. D. 260 と 0. D. 280 の値を測定して RNA 濃度を測った。53 μ g の total RNA を得た。

【0065】

(2) First strand cDNAの合成

total RNA 4 μ g を使用し、First strand cDNA の合成キット "Ready To Go" (Amersham Pharmacia) により cDNA (33 μ l) を合成した。

【0066】

(3) Degenerated PCR

合成した First strand cDNA (33 μ l) のうち 3 μ l を鋳型として PCR を行った。プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直し作製した。

使用プライマー

5' - GAAGGRTGYGTCAAYGGRCAY -3' (primer1) (配列番号 9)

5' - ACVGGDCCATYDGVAAGAAARTT -3' (primer2) (配列番号 10)

I はイノシン、R は A 又は G、Y は C 又は T、V は A、C 又は G、D は A、G 又は T S は C 又は G、H は A、T 又は C を示す。

【0067】

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 taq バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
100 μ M primer1	1 μ l
100 μ M primer2	1 μ l
ミリQ	35 μ l
taq polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

【 0 0 6 8 】

PCR反応条件

94℃ 1分(PAD)

94℃ 30秒(変性)

52℃ 30秒(鋳型へのプライマーのアニーリング)

72℃ 1分(プライマーの伸長)

上記3ステップを35サイクル行った。

72℃ 7分(最後の伸長)

4℃ 保持

【 0 0 6 9 】

一回目のPCR反応で得られた増幅産物1 μ lをテンプレートとして、もう一度同じ条件でPCRを行った。アガロースゲル電気泳動で、350bpを切り出し、精製した。

【 0 0 7 0 】

(4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製したDNA断片をpT7-blue vector(Novagen)にライゲーションした。大腸菌株(TG1)にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌よりplasmid DNAを精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してそのDNA塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したのに関して、5'-RACE法および3'-RACE法による遺伝子全長のクローニングを行った。

【 0 0 7 1 】

(5) 5'-RACE法

Degenerated PCRで得られたDNA断片の5'側の塩基配列を決定するために5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0(GIBCO BRL)を用いて、5'-RACE法を行った。鋳型として(1)で調整したtotal RNAを5 μ g使用した。

dC-tailed cDNAの一回目の増幅には

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' (primer3) (配列番号11)

5'-CTCAGGGAATGACTGCTTTACAT-3' (primer4) (配列番号12)

のプライマーを用いた。

Iはイノシンを示す。

【 0 0 7 2 】

二回目の増幅には

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (primer5) (配列番号13)

5'-GTCTTCAGGGTACTTGGTGA-3' (primer6) (配列番号14)

のプライマーを用いた。PCR反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

【 0 0 7 3 】

アガロースゲル電気泳動で、増幅された350bpのバンドを切り出し、精製した。精製したDNA断片をpT7-blue vector(Novagen)にライゲーションした。大腸菌株(TG1)にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌よりplasmid DNAを精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。

【 0 0 7 4 】

(6) 3'-RACE法

Degenerated PCRで得られたDNA断片の3'側部分は、(4)の塩基配列決定で得られた情報を基に作製したプライマーとオリゴdTプライマーのPCRで得た。鋳型として(2)で調整したfirst strand cDNAを3 μ l使用した。

作成したプライマーは、

5'-ATGTAAAGCAGTCATTCCCTGAG-3' (primer7) (配列番号15)

【 0 0 7 5 】

PCR反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 taq バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
20 μ M primer7	1 μ l
10 μ M オリゴdTprimer	1 μ l
ミリQ	35 μ l
taq polymerase(5U/ μ l)	1 μ l

【 0 0 7 6 】

PCR反応条件

94℃ 1min(PAD)
94℃ 30sec (変性)
52℃ 30sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)
72℃ 1min (プライマーの伸長)
上記3ステップを30サイクル行った。
72℃ 7min (最後の伸長)
4℃ 保持

【 0 0 7 7 】

アガロースゲル電気泳動で、増幅された約650bpのバンドを切り出し、精製した。精製したDNA断片をpT7-blue vector(Novagen)にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌よりplasmid DNAを精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。

【 0 0 7 8 】

(7) 大腸菌での蛋白発現

得られた全長の塩基配列より、蛋白のN末端に相当する部分でプライマーを作製し、C末端側はオリゴdTプライマーを使用して、(2)で調整したFirst strand cDNAを鋳型としてPCRを行った。全アミノ酸配列および全塩基配列を配列表の配列番号1及び2に示す。配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をC0CPと称する。

使用プライマー

5'- CCCGATCCGACCATGGCTACCTTGGTTAAAGA -3' (primer8) (配列番号16)

【 0 0 7 9 】

PCR反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 pyrobest バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
100uM primer8	1 μ l
100uM オリゴdTプライマー	1 μ l
ミリQ	35 μ l
pyrobest polymerase(5U/ μ l)	1 μ l

【 0 0 8 0 】

PCR反応条件

94℃ 1min(PAD)
94℃ 30sec (変性)
52℃ 30sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)
72℃ 1min (プライマー伸長)
上記3ステップを30サイクル行った。
72℃ 7min (最後の伸長)
4℃ 保持

【 0 0 8 1 】

アガロースゲルの電気泳動で、増幅された約800bpのバンドを切り出し、精製してpRSET

vector(Invitrogen)のBamH I、EcoR I 部位にサブクローニングして、大腸菌株 (JM109-D E3) で発現させた。発現蛋白はN末端にHis-tagが付くようにコンストラクトしたので発現蛋白はNi-Agarose gel(QIAGEN)で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。次に精製した蛋白の性質を解析した。

【 0 0 8 2 】

(8) 光吸収特性の解析

20 μ M色素蛋白、50mM HEPES pH7.9溶液を用いて吸収スペクトルを測定した。このスペクトルのピークの値よりモル吸光係数を計算した。コモンサンゴ由来色素蛋白 (COCP) では576nmに吸収のピークが認められた (表 1、図 1) 。また、pH4~10で安定していた。(図 2)

【 0 0 8 3 】

【表 1】

Montipora.spより単離された色素蛋白質(COCP)の特性

表 1

	吸収極大	蛍光極大	モル吸光係数	量子収率	pH感受性	アミノ酸数
COCP	576nm	—	64000(576nm)	—	なし	221a.a.
keima616	440nm	616nm	28000(440nm)	0.24	あり	222a.a.

【 0 0 8 4 】

(9) 色素蛋白質から蛍光蛋白質への改変

COCPは蛍光蛋白質ではない。しかしCOCPの1番目のメチオニンと2番目のセリンの間にバリンを挿入し、94番目のヒスチジンをアスパラギンに、142番目のアスパラギンをセリンに、157番目のアスパラギンをアスパラギン酸に、202番目のリジンをアルギニンに、206番目のフェニルアラニンをセリンに置き換えることにより蛍光性を獲得した。この改変蛍光蛋白質をCOCP-FLとした (アミノ酸配列を配列番号 3 に示し、塩基配列を配列番号 4 に示す) 。COCP-FLは560nmに励起のピークを持つ。この励起によって蛍光スペクトルは600nmにピークを示す。

【 0 0 8 5 】

(1 0) ストークスシフトの大きな赤色蛍光蛋白質の作製

COCP-FLの62番目のセリンをフェニルアラニンに、93番目のイソロイシンをトレオニンに、124番目のバリンをトレオニンに、159番目のフェニルアラニンをチロシンに、192番目のバリンをイソロイシンに、214番目のセリンをアラニンに置き換えることによりCOCP-FLとは異なる蛍光をもつ蛋白質を獲得した。この改変蛍光蛋白質をkeima616 (アミノ酸配列を配列番号 5 に示し、塩基配列を配列番号 6 に示す) とした。440nmに励起のピークをもち、この励起によって蛍光スペクトルは616nmにピークを持つ (図 3、表 1) 。ストークスシフトは176nmと非常に大きな値である。従来の蛍光蛋白質に比べ励起波長域と蛍光波長域を大きくとることができ、蛍光測定時に効率よく測定できる。また、同時多色蛍光測定も可能である。同一励起波長をもつ蛍光色素を用いることによりレーザーなど単一波長での励起による二つの波長での測光ができる。いままでの蛍光蛋白では同じ励起スペクトルをもつ蛋白がないためできなかったことで、これらの蛋白を用いることで励起のちがいによる測定のぶれという問題を解決できる。

【 0 0 8 6 】

(1 1) ストークスシフトの大きな橙色蛍光蛋白質の作製

Keima616の62番目のフェニルアラニンをメチオニンに、63番目のグルタミンをシステインに置き換えることにより蛍光蛋白質を獲得した。この改変蛍光蛋白質をKeima570 (アミノ酸配列を配列番号 7 に示し、塩基配列を配列番号 8 に示す) とした。このKeima570はKeima616と同様440nmに励起のピークを持ち、この励起により570nmの蛍光のピークを示す (図 4) 。ストークスシフトは130nmと大きな値である。従来の蛍光蛋白質に比べ励起波長域と蛍光波長域を大きくとることができ、蛍光測定時に効率よく測定できる。また、同時多色蛍光測定も可能である。同一励起波長をもつ蛍光色素を用いることによりレーザーなど

単一波長での励起による二つの波長での測光ができる。いままでの蛍光蛋白では同じ励起スペクトルをもつ蛋白がないためできなかったことで、これらの蛋白を用いることで励起のちがいによる測定のおれという問題を解決できる。

【 0 0 8 7 】

(1 2) pH感受性の測定

50mMの下記の緩衝液中で蛋白質 (Keima616及びKeima570) の吸収スペクトルを測定した (図 5 及び 6) 。

各pHの緩衝液は次の通り、

pH4、5、5.5 : 酢酸バッファー

pH6 : リン酸バッファー

pH6.6 : MOPSバッファー

pH7、7.5、8 : HEPESバッファー

pH9、10 : グリシンバッファー

pH7.5~10でピークの値は安定していた。(図 5 及び図 6)

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 8 】

【図 1】 図 1 は、COCPの吸収スペクトルを示す。

【図 2】 図 2 は、COCPの pH感受性の測定結果を示す。

【図 3】 図 3 は、Keima616の励起スペクトルと蛍光スペクトルを示す。

【図 4】 図 4 は、Keima570の励起スペクトルと蛍光スペクトルを示す。

【図 5】 図 5 は、Keima616のpH感受性の測定結果を示す。

【図 6】 図 6 は、Keima570のpH感受性の測定結果を示す。

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Dye and fluorescent proteins

<130> A31700A

<160> 16

 $\langle 210 \rangle$ 1

$\langle 211 \rangle$ 221

<212> PRT

<213> Montipora. sp

<400> 1

Met Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met Ser Gly
1 5 10 15

Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly Lys
20 25 30

Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly Gly
35 40 45

Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Ser Gln Tyr Gly
50 55 60

Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr Val Lys
65 70 75 80

Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Ile Met His Phe Glu
85 90 95

Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly Asn
100 105 110

Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Val Asn Phe Pro Pro Asn
115 120 125

Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Asn Thr Glu
130 135 140

Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asn Phe Met Ala
145 150 155 160

Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser Thr
165 170 175

Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Val Asp
180 185 190

Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Lys Asp Tyr Thr Phe Val Glu
195 200 205

Gln Cys Glu Ile Ser Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly
210 215 220

<210> 2

<211> 666

<212> DNA

<213> Montipora. sp

<400> 2

atg agt gtg atc gct aaa caa atg acc tac aag gtt tat atg tca ggc
Met Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met Ser Gly

1 5 10 15
acg gtc aat gga cac tac ttt gag gtc gaa ggc gat gga aaa gga aag

Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly Lys


```

      20      25      30
cct tac gag ggg gag cag acg gta aag ctc act gtc acc aag ggt gga
Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly Gly
      35      40      45
cct ctg cca ttt gct tgg gat att tta tca cca ctg tct cag tac gga
Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Ser Gln Tyr Gly
      50      55      60
agc ata cca ttc acc aag tac cct gaa gac atc cct gat tat gta aag
Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr Val Lys
      65      70      75      80
cag tca ttc cct gag gga tat aca tgg gag agg atc atg cac ttt gaa
Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Ile Met His Phe Glu
      85      90      95
gat ggt gca gtg tgt act gtc agc aat gat tcc agc atc caa ggc aac
Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly Asn
      100      105      110
tgt ttc atc tac aat gtc aaa atc tct ggt gtg aac ttt cct ccc aat
Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Val Asn Phe Pro Pro Asn
      115      120      125
gga cct gtt atg cag aag aag aca cag ggc tgg gaa ccc aac act gag
Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Asn Thr Glu
      130      135      140
cgt ctc ttt gca cga gat gga atg ctg ata gga aac aac ttt atg gct
Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asn Phe Met Ala
      145      150      155      160
ctg aag ttg gaa gga ggt ggt cac tat ttg tgt gaa ttc aaa tct act
Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser Thr
      165      170      175
tac aag gca aag aag cct gtg agg atg cca ggg tat cac tat gtt gac
Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Val Asp
      180      185      190
cgc aaa ctg gat gta acc agt cac aac aag gat tac aca ttt gtt gag
Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Lys Asp Tyr Thr Phe Val Glu
      195      200      205
cag tgt gaa ata tcc att gca cgc cac tct ttg ctc ggt tga
Gln Cys Glu Ile Ser Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly
      210      215      220

```

<210> 3

<211> 222

<212> PRT

<213> Montipora. sp

<400> 3

```

Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met Ser
  1      5      10      15
Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly
      20      25      30
Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly
      35      40      45
Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Ser Gln Tyr
      50      55      60

```

Gly	Ser	Ile	Pro	Phe	Thr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Asp	Ile	Pro	Asp	Tyr	Val
65					70					75					80
Lys	Gln	Ser	Phe	Pro	Glu	Gly	Tyr	Thr	Trp	Glu	Arg	Ile	Met	Asn	Phe
			85						90					95	
Glu	Asp	Gly	Ala	Val	Cys	Thr	Val	Ser	Asn	Asp	Ser	Ser	Ile	Gln	Gly
			100					105					110		
Asn	Cys	Phe	Ile	Tyr	Asn	Val	Lys	Ile	Ser	Gly	Val	Asn	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Asn	Gly	Pro	Val	Met	Gln	Lys	Lys	Thr	Gln	Gly	Trp	Glu	Pro	Ser	Thr
		130				135					140				
Glu	Arg	Leu	Phe	Ala	Arg	Asp	Gly	Met	Leu	Ile	Gly	Asn	Asp	Phe	Met
145					150					155					160
Ala	Leu	Lys	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	His	Tyr	Leu	Cys	Glu	Phe	Lys	Ser
				165					170					175	
Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Lys	Pro	Val	Arg	Met	Pro	Gly	Tyr	His	Tyr	Val
			180					185					190		
Asp	Arg	Lys	Leu	Asp	Val	Thr	Ser	His	Asn	Arg	Asp	Tyr	Thr	Ser	Val
		195					200					205			
Glu	Gln	Cys	Glu	Ile	Ser	Ile	Ala	Arg	His	Ser	Leu	Leu	Gly		
	210					215					220				

<210> 4

<211> 669

<212> DNA

<213> Montipora. sp

<400> 4

atg	gtg	agt	gtg	atc	gct	aaa	caa	atg	acc	tac	aag	gtt	tat	atg	tca
Met	Val	Ser	Val	Ile	Ala	Lys	Gln	Met	Thr	Tyr	Lys	Val	Tyr	Met	Ser
1				5					10					15	
ggc	acg	gtc	aat	gga	cac	tac	ttt	gag	gtc	gaa	ggc	gat	gga	aaa	gga
Gly	Thr	Val	Asn	Gly	His	Tyr	Phe	Glu	Val	Glu	Gly	Asp	Gly	Lys	Gly
			20					25					30		
aag	cct	tac	gag	gga	gag	cag	aca	gta	aag	ctc	act	gtc	acc	aag	ggt
Lys	Pro	Tyr	Glu	Gly	Glu	Gln	Thr	Val	Lys	Leu	Thr	Val	Thr	Lys	Gly
		35				40						45			
gga	cct	ctg	cca	ttt	gct	tgg	gat	att	tta	tca	cca	ctg	tct	cag	tac
Gly	Pro	Leu	Pro	Phe	Ala	Trp	Asp	Ile	Leu	Ser	Pro	Leu	Ser	Gln	Tyr
	50					55					60				
gga	agc	ata	cca	ttc	acc	aag	tac	cct	gaa	gac	atc	cct	gat	tat	gta
Gly	Ser	Ile	Pro	Phe	Thr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Asp	Ile	Pro	Asp	Tyr	Val
	65				70					75					80
aag	cag	tca	ttc	cct	gag	gga	tat	aca	tgg	gag	agg	atc	atg	aac	ttt
Lys	Gln	Ser	Phe	Pro	Glu	Gly	Tyr	Thr	Trp	Glu	Arg	Ile	Met	Asn	Phe
			85						90					95	
gaa	gat	ggt	gca	gtg	tgt	act	gtc	agc	aat	gat	tcc	agc	atc	caa	ggc
Glu	Asp	Gly	Ala	Val	Cys	Thr	Val	Ser	Asn	Asp	Ser	Ser	Ile	Gln	Gly
			100					105					110		
aac	tgt	ttc	atc	tac	aat	gtc	aaa	atc	tct	ggt	gtg	aac	ttt	cct	ccc
Asn	Cys	Phe	Ile	Tyr	Asn	Val	Lys	Ile	Ser	Gly	Val	Asn	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
aat	gga	cct	gtt	atg	cag	aag	aag	aca	cag	ggc	tgg	gaa	ccc	agc	act

```

Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser Thr
 130                      135                      140
gag cgt ctc ttt gca cga gat gga atg ctg ata gga aac gat ttt atg
Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Phe Met
145                      150                      155                      160
gct ctg aag ttg gaa gga ggt ggt cac tat ttg tgt gaa ttc aaa tct
Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser
                      165                      170                      175
act tac aag gca aag aag cct gtg agg atg cca ggg tat cac tat gtt
Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Val
                      180                      185                      190
gac cgc aaa ctg gat gta acc agt cac aac agg gat tac aca tct gtt
Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser Val
                      195                      200                      205
gag cag tgt gaa ata tcc att gca cgc cac tct ttg ctc ggt tga
Glu Gln Cys Glu Ile Ser Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly
 210                      215                      220
<210> 5
<211> 222
<212> PRT
<213> Montipora. sp
<400> 5
Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met Ser
 1                      5                      10                      15
Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly
                      20                      25                      30
Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly
                      35                      40                      45
Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Phe Gln Tyr
 50                      55                      60
Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr Val
 65                      70                      75                      80
Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Met Asn Phe
                      85                      90                      95
Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly
 100                      105                      110
Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Thr Asn Phe Pro Pro
 115                      120                      125
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser Thr
 130                      135                      140
Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr Met
145                      150                      155                      160
Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser
                      165                      170                      175
Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Ile
 180                      185                      190
Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser Val
 195                      200                      205
Glu Gln Cys Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly
 210                      215                      220

```

<210> 6
 <211> 669
 <212> DNA
 <213> Montipora. sp
 <400> 6

```

atg gtg agt gtg atc gct aaa caa atg acc tac aag gtt tat atg tca
Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met Ser
  1              5              10              15
ggc acg gtc aat gga cac tac ttt gag gtc gaa ggc gat gga aaa gga
Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly
              20              25              30
aag cct tac gag gga gag cag aca gta aag ctc act gtc acc aag ggt
Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly
              35              40              45
gga cct ctg cca ttt gct tgg gat att tta tca cca ctg ttt cag tac
Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Phe Gln Tyr
              50              55              60
gga agc ata cca ttc acc aag tac cct gaa gac atc cct gat tat gta
Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr Val
              65              70              75              80
aag cag tca ttc cct gag gga tat aca tgg gag agg acc atg aac ttt
Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Met Asn Phe
              85              90              95
gaa gat ggt gca gtg tgt act gtc agc aat gat tcc agc atc caa ggc
Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly
              100              105              110
aac tgt ttc atc tac aat gtc aaa atc tct ggt acg aac ttt cct ccc
Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Thr Asn Phe Pro Pro
              115              120              125
aat gga cct gtt atg cag aag aag aca cag ggc tgg gaa ccc agc act
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser Thr
              130              135              140
gag cgt ctc ttt gca cga gat gga atg ctg ata gga aac gat tat atg
Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr Met
              145              150              155              160
gct ctg aag ttg gaa gga ggt ggt cac tat ttg tgt gaa ttt aaa tct
Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser
              165              170              175
act tac aag gca aag aag cct gtg agg atg cca ggg tat cac tat att
Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Ile
              180              185              190
gac cgc aaa ctg gat gta acc agt cac aac agg gat tac aca tct gtt
Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser Val
              195              200              205
gag cag tgt gaa ata gcc att gca cgc cac tct ttg ctc ggt tga
Glu Gln Cys Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly
              210              215              220

```

<210> 7
 <211> 222
 <212> PRT

<213> Montipora. sp

<400> 7

Met	Val	Ser	Val	Ile	Ala	Lys	Gln	Met	Thr	Tyr	Lys	Val	Tyr	Met	Ser
1				5					10					15	
Gly	Thr	Val	Asn	Gly	His	Tyr	Phe	Glu	Val	Glu	Gly	Asp	Gly	Lys	Gly
			20					25					30		
Lys	Pro	Tyr	Glu	Gly	Glu	Gln	Thr	Val	Lys	Leu	Thr	Val	Thr	Lys	Gly
		35					40					45			
Gly	Pro	Leu	Pro	Phe	Ala	Trp	Asp	Ile	Leu	Ser	Pro	Leu	Met	Cys	Tyr
	50					55					60				
Gly	Ser	Ile	Pro	Phe	Thr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Asp	Ile	Pro	Asp	Tyr	Val
65					70					75					80
Lys	Gln	Ser	Phe	Pro	Glu	Gly	Tyr	Thr	Trp	Glu	Arg	Thr	Met	Asn	Phe
			85					90						95	
Glu	Asp	Gly	Ala	Val	Cys	Thr	Val	Ser	Asn	Asp	Ser	Ser	Ile	Gln	Gly
			100					105					110		
Asn	Cys	Phe	Ile	Tyr	Asn	Val	Lys	Ile	Ser	Gly	Thr	Asn	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Asn	Gly	Pro	Val	Met	Gln	Lys	Lys	Thr	Gln	Gly	Trp	Glu	Pro	Ser	Thr
	130					135					140				
Glu	Arg	Leu	Phe	Ala	Arg	Asp	Gly	Met	Leu	Ile	Gly	Asn	Asp	Tyr	Met
145				150					155						160
Ala	Leu	Lys	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	His	Tyr	Leu	Cys	Glu	Phe	Lys	Ser
			165					170						175	
Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Lys	Pro	Val	Arg	Met	Pro	Gly	Tyr	His	Tyr	Ile
			180					185					190		
Asp	Arg	Lys	Leu	Asp	Val	Thr	Ser	His	Asn	Arg	Asp	Tyr	Thr	Ser	Val
		195				200						205			
Glu	Gln	Cys	Glu	Ile	Ala	Ile	Ala	Arg	His	Ser	Leu	Leu	Gly		
	210					215					220				

<210> 8

<211> 669

<212> DNA

<213> Montipora. sp

<400> 8

atg	gtg	agt	gtg	atc	gct	aaa	caa	atg	acc	tac	aag	gtt	tat	atg	tca
Met	Val	Ser	Val	Ile	Ala	Lys	Gln	Met	Thr	Tyr	Lys	Val	Tyr	Met	Ser
1				5					10					15	
ggc	acg	gtc	aat	gga	cac	tac	ttt	gag	gtc	gaa	ggc	gat	gga	aaa	gga
Gly	Thr	Val	Asn	Gly	His	Tyr	Phe	Glu	Val	Glu	Gly	Asp	Gly	Lys	Gly
			20					25					30		
aag	cct	tac	gag	gga	gag	cag	aca	gta	aag	ctc	act	gtc	acc	aag	ggt
Lys	Pro	Tyr	Glu	Gly	Glu	Gln	Thr	Val	Lys	Leu	Thr	Val	Thr	Lys	Gly
		35					40					45			
gga	cct	ctg	cca	ttt	gct	tgg	gat	att	tta	tca	cca	ctg	atg	tgt	tac
Gly	Pro	Leu	Pro	Phe	Ala	Trp	Asp	Ile	Leu	Ser	Pro	Leu	Met	Cys	Tyr
	50					55					60				
gga	agc	ata	cca	ttc	acc	aag	tac	cct	gaa	gac	atc	cct	gat	tat	gta
Gly	Ser	Ile	Pro	Phe	Thr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Asp	Ile	Pro	Asp	Tyr	Val
65					70					75					80

```

aag cag tca ttc cct gag gga tat aca tgg gag agg acc atg aac ttt
Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Met Asn Phe
      85                      90                      95
gaa gat ggt gca gtg tgt act gtc agc aat gat tcc agc atc caa ggc
Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly
      100                      105                      110
aac tgt ttc atc tac aat gtc aaa atc tct ggt acg aac ttt cct ccc
Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Thr Asn Phe Pro Pro
      115                      120                      125
aat gga cct gtt atg cag aag aag aca cag ggc tgg gaa ccc agc act
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser Thr
      130                      135                      140
gag cgt ctc ttt gca cga gat gga atg ctg ata gga aac gat tat atg
Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr Met
      145                      150                      155                      160
gct ctg aag ttg gaa gga ggt ggt cac tat ttg tgt gaa ttt aaa tct
Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser
      165                      170                      175
act tac aag gca aag aag cct gtg agg atg cca ggg tat cac tat att
Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Ile
      180                      185                      190
gac cgc aaa ctg gat gta acc agt cac aac agg gat tac aca tct gtt
Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser Val
      195                      200                      205
gag cag tgt gaa ata gcc att gca cgc cac tct ttg ctc ggt tga
Glu Gln Cys Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly
      210                      215                      220

```

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

gaaggrtgyg tcaayggrca y

21

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

acvggdccat ydgvaagaaa rtt

23

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

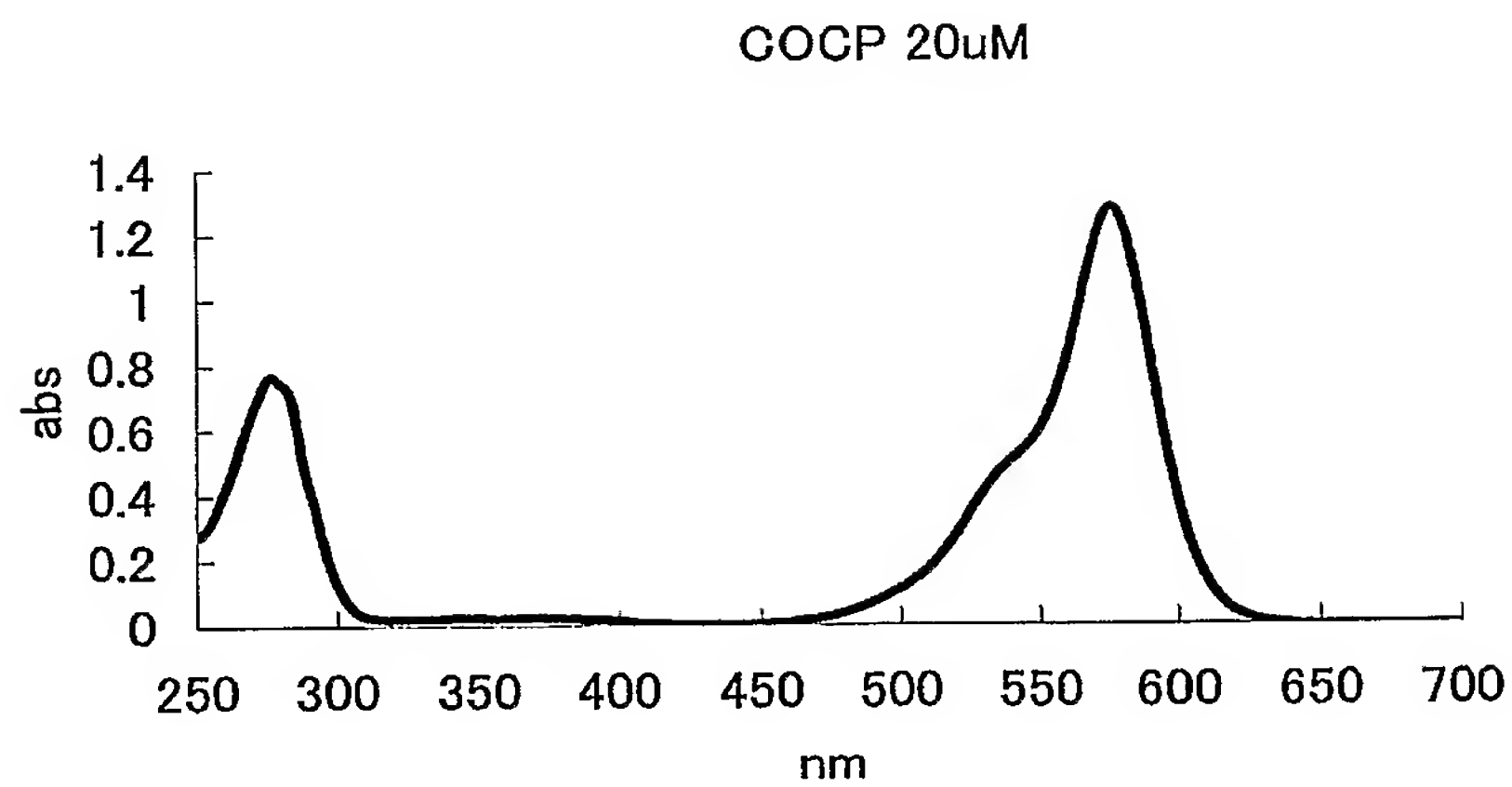
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

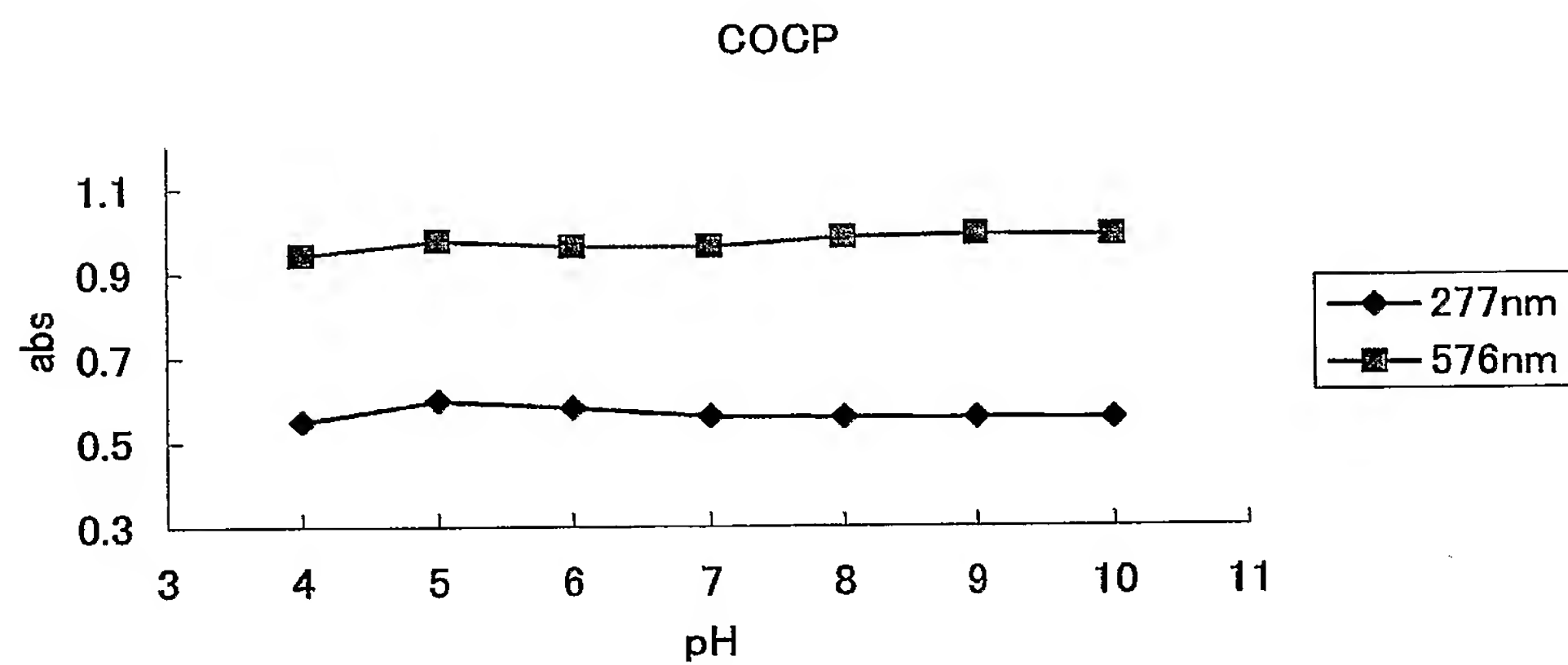
ggccacgcgt cgactagtac gggiigggii gggiig 36
<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 12
ctcagggaat gactgcttta cat 23
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 13
ggccacgcgt cgactagtac 20
<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 14
gtcttcaggg tacttggtga 20
<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 15
atgtaaagca gtcattccct gag 23
<210> 16
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 16
cccgatccg accatggcta ccttggttaa aga 33

【書類名】 図面

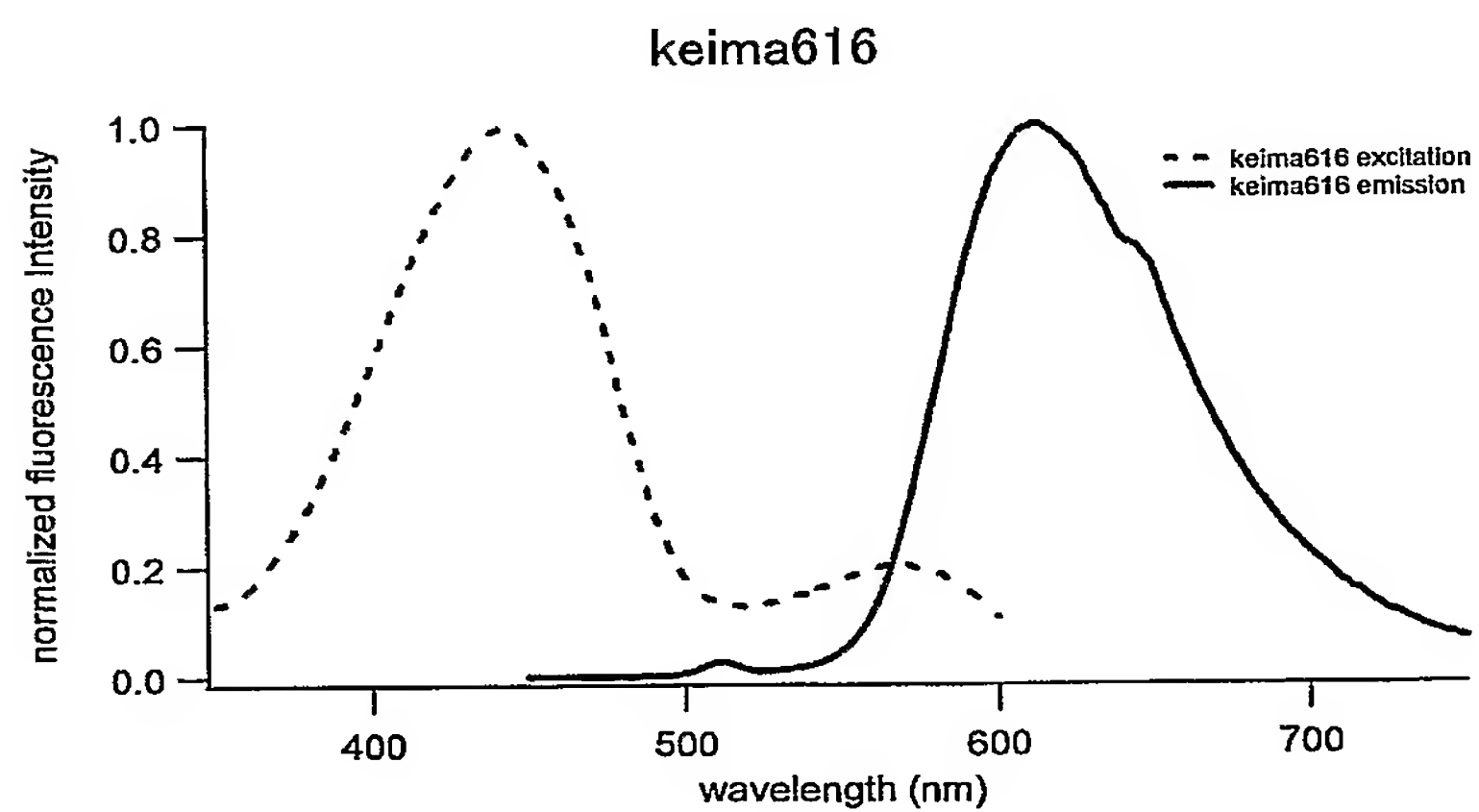
【図 1】



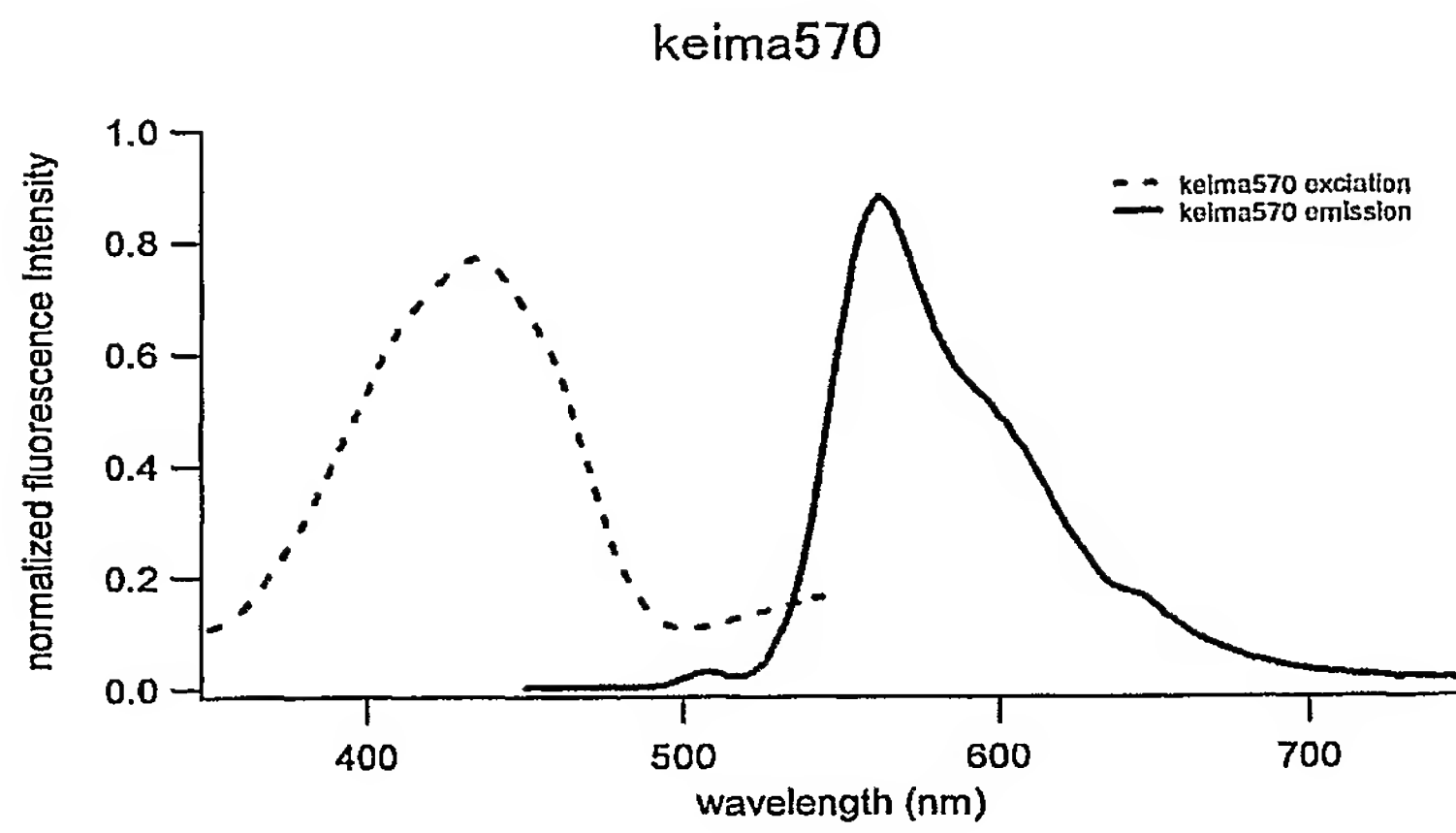
【図 2】



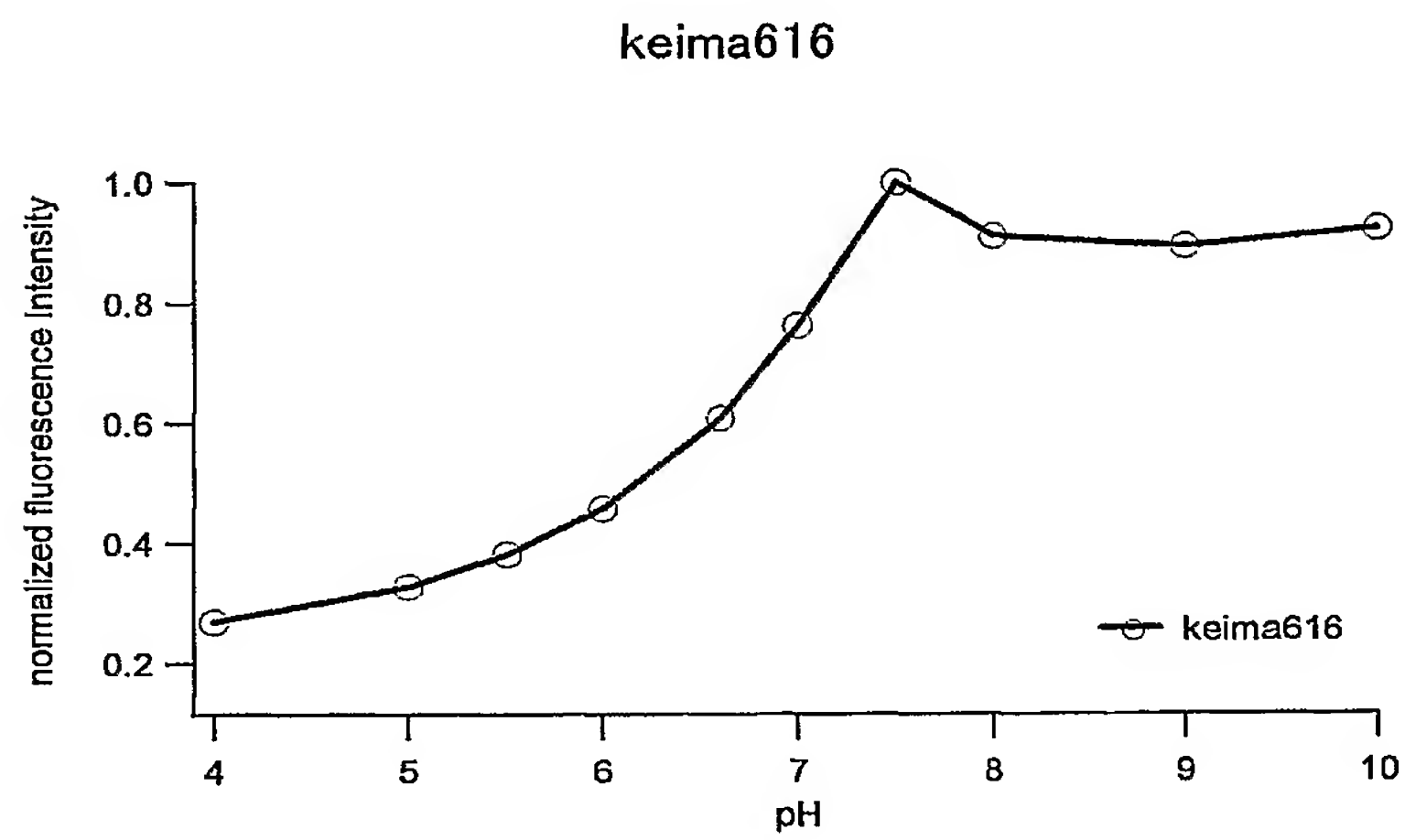
【図 3】



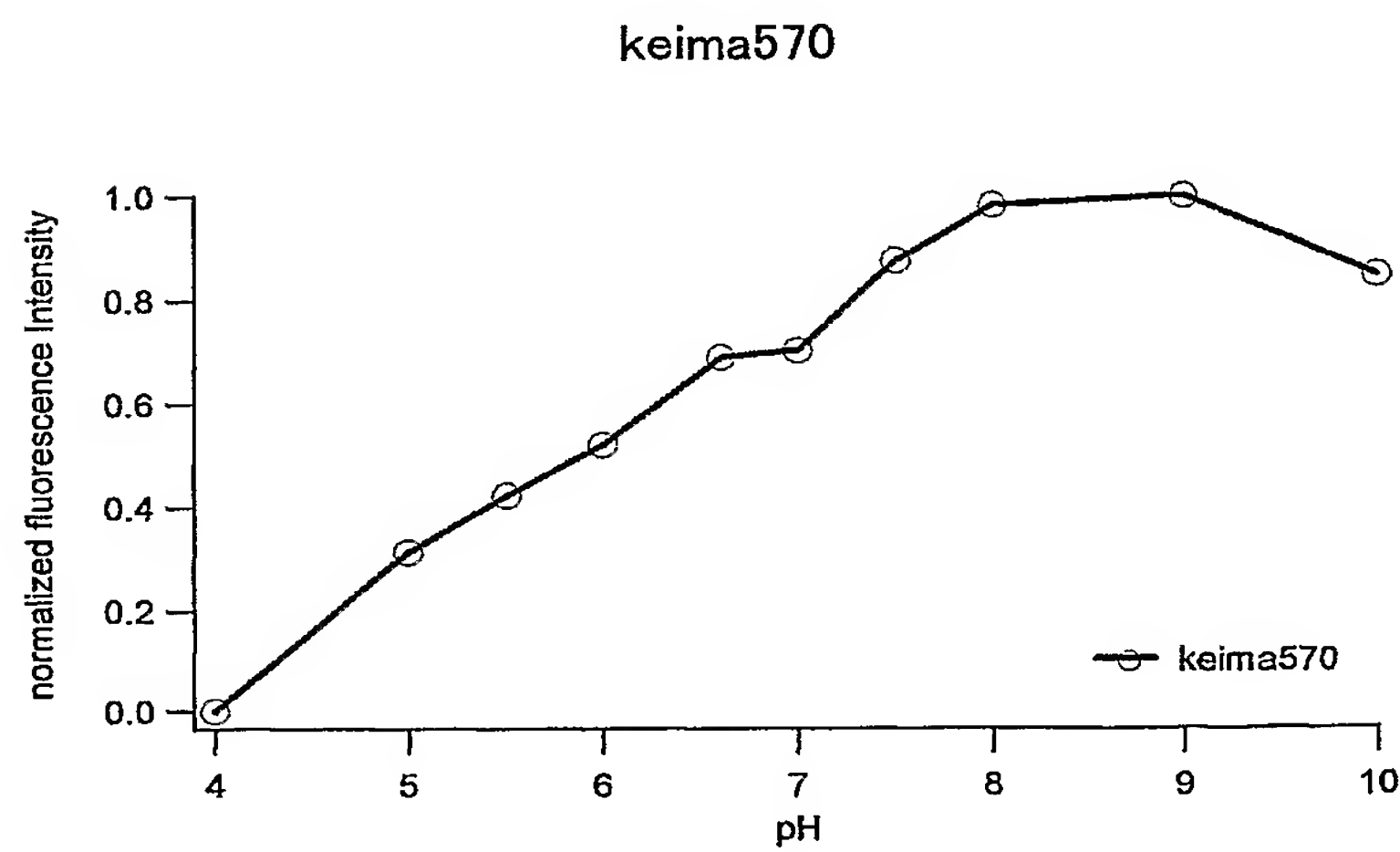
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 励起のピーク値（吸収極大波長）と蛍光のピーク値（蛍光極大波長）の差（ストークスシフト）を大きくすることにより、最大の励起で最大の蛍光を得ることができることを特徴とする赤色又は橙色の蛍光蛋白質を提供すること。

【解決手段】 以下の（a）又は（b）に示す蛍光蛋白質。

（a）配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

（b）配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有し、かつ 1 0 0 n m 以上のストークスシフトを有する蛋白質。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 1 8 3 4 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 5 9 8 2 1]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号

氏 名

独立行政法人理化学研究所

特願 2 0 0 4 - 0 1 8 3 4 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 0 0 0 4 0 9 7]

1. 変更年月日

1 9 9 8 年 7 月 2 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

愛知県名古屋市中区丸の内 3 丁目 5 番 1 0 号 住友商事丸の内
ビル 5 F

氏 名

株式会社医学生物学研究所